

**ФІЗИЧНАЯ ХІМІЯ**

УДК 544.723.21+546.57+577.164.17+534-8

*А. В. АБАКШОНОК<sup>1</sup>, А. Н. ЕРЕМИН<sup>1</sup>, В. Е. АГАБЕКОВ<sup>1</sup>, Г. К. ЖАВНЕРКО<sup>1</sup>,  
Е. А. ГРАЧЕВА<sup>1</sup>, Е. А. ПЕТРОВА<sup>2</sup>, Т. И. ТЕРПИНСКАЯ<sup>2</sup>*

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ С НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА**

<sup>1</sup>*Институт химии новых материалов НАН Беларуси,*

<sup>2</sup>*Институт физиологии НАН Беларуси*

*(Поступила в редакцию 17.05.2013)*

Известно, что наночастицы (НЧ) благородных металлов являются наиболее перспективной основой наноносителей терапевтических молекул [1–4]. Так, НЧ золота увеличивают время жизни биоактивных соединений в живом организме, предотвращают или замедляют их удаление из клетки, направляют лекарственное средство на клетки-мишени, а само функционализирующее соединение повышает коллоидную стабильность частиц, предупреждая их агрегацию [1, 3].

НЧ серебра (НЧАg) характеризуются биосовместимостью, интенсивным поверхностным плазмонным резонансом, развитой поверхностью, каталитической активностью и высокой емкостью двойного электрического слоя [5], что является весьма существенным для использования этих частиц в качестве наноносителей биоактивных соединений. По сравнению с золотом, серебро более активный металл, что усложняет получение монодисперсных НЧАg, длительное время сохраняющих коллоидную стабильность [5]. Биоактивные соединения физически адсорбируются на НЧАg или же присоединяются к ним ковалентно через тиольные соединения, содержащие доступные для активации NH<sub>2</sub>-, HO- и HOOC-группы [2–5]. Адресную доставку терапевтических молекул в опухолевые клетки, содержащие фолатный рецептор, может обеспечить фолиевая кислота (ФК), связанная с НЧАg [4]. Антрациклиновые антибиотики цитостатического спектра действия (даунорубин и доксорубин) были электростатически присоединены к НЧАg [2, 4] или к ассоциату ФК с НЧАg [4]. Полученные ассоциаты проявили высокую селективность к раковым клеткам лейкемии K562 [2] и культуры KB [4], обеспечили повышенное внутриклеточное содержание цитостатических антибиотиков и их эффективное освобождение [2, 4].

Цель данного исследования – разработка новых способов получения *in situ* ассоциатов ФК с НЧАg, оценка эффективности их связывания с мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани мышей и влияния на жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ).

**Методика эксперимента.** В работе использовали AgNO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, цитрат натрия, глюкозу, NaCl и (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> («Реахим», Россия), изопропанол («Eurochemicals», Литва), ацетон («Экос-1», Россия), диметилсульфоксид («Вектон», Россия), полиэтиленимин («Aldrich», США), ФК («Appli-Chem», Германия), трипановый синий, трипсин-ЭДТА, культуральную среду ДМЕМ и антибиотик (пенициллин-стрептомицин-амфотерицин («Sigma», США), эмбриональную телячью сыворотку («HyClone», США).

*Ассоциаты ФК–НЧАg* получали в процессе одновременного синтеза НЧАg и их функционализации ФК или же сначала формировали НЧАg, а затем модифицировали их ФК. Синтез НЧАg в присутствии ФК проводили в водном растворе, содержащем 0,5 мМ цитрата натрия, 7,0 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 мМ AgNO<sub>3</sub>, 0,3 мМ ФК и 50 мМ глюкозы. В первом варианте синтеза полученный раствор оставляли на 3 ч при комнатной температуре и активном перемешивании на магнитной

мешалке, а во втором – на реакционный раствор воздействовали ультразвуком (УЗ) в течение 3 ч, используя УЗ ванну Elmasonic S 30 Н (Германия), характеризующуюся частотой 37 кГц, эффективной мощностью 60 Вт и максимальной пиковой мощностью 240 Вт. В процессе синтеза температура воды в ванне повышалась от 16 до 62 °С (0 ч – 16–18, 0,5 ч – 34–35, 1 ч – 45–47, 2 ч – 59–60, 3 ч – 61–62 °С).

Синтез НЧАг в отсутствие ФК проводили в водном растворе, содержащем 0,5 мМ цитрата натрия, 7,0–10,0 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 мМ AgNO<sub>3</sub> и 50 мМ глюкозы. Полученный реакционный раствор обрабатывали УЗ в течение 3 ч. Затем в золь серебра добавляли водный раствор ФК (0,3 мМ) и выдерживали в течение 16–17 ч в темноте при комнатной температуре.

*Выделение НЧАг и ассоциата ФК–НЧАг из среды синтеза.* К 1,0 мл золя серебра добавляли 1,0 мл раствора NaCl (или (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) до конечной концентрации 0,3 М или же в золь вносили 1,0 мл метанола (или этанола, изопропанола, ацетона). Смесь охлаждали до 6 °С в течение 2 ч, а затем центрифугировали 25 мин при 19000 об/мин (Beckman Coulter Allegra 64R, США). Супернатант удаляли, а осадок суспендировали в водном растворе 0,5 мМ цитрата натрия.

Спектры поглощения НЧАг и ФК–НЧАг регистрировали на спектрофлуориметре CM 2203 («SOLAR», Беларусь). Диаметр (*d*, нм) НЧАг определяли по калибровочной зависимости «λ<sub>max</sub> от *d*», составленной по данным [5]. Размер частиц также оценивали по АСМ-изображениям (контактный режим), полученным на микроскопе Nanoscope-3D («Veeco», США) [6]. Исследуемые образцы адсорбировали на кремниевую подложку, модифицированную полиэтиленгликолем, предварительно очищенную нагреванием в растворе H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7:3) в течение 30 мин при ~50 °С. Промытую подложку выдерживали 20 мин при комнатной температуре в растворе полиэтиленгликоля (3 мг/мл), промывали ее дистиллированной водой и высушивали. На поверхность модифицированной подложки наносили 8 мкл образца, через 20 мин ее промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре.

ИК-спектры ФК и ФК–НЧАг регистрировали на приборе ИК-Фурье спектрометр TENSOR 27 (Bruker, Германия) с разрешением 1 см<sup>-1</sup>. В золь НЧАг вносили аликвоту ФК, хорошо перемешивали и оставляли на 17 ч в темноте при комнатной температуре. Затем золь центрифугировали 25 мин при 20000 об/мин. Супернатант удаляли, а осадок ФК–НЧАг два раза промывали ДМСО и ресуспендировали его в ДМСО.

При подготовке НЧАг и ФК–НЧАг для оценки их цитотоксичности растворы образцов центрифугировали 30 мин при 20000 об/мин, полученный осадок промывали ДМСО и суспендировали его в водном растворе, содержащем 3,0 мМ NaHCO<sub>3</sub> и 10 мМ глюкозы.

*Влияние НЧАг и ФК–НЧАг на жизнеспособность клеток АКЭ.* Золи НЧАг и ФК–НЧАг центрифугировали 30 мин при 20000 об/мин, полученный осадок промывали ДМСО и суспендировали в водном растворе 3,0 мМ NaHCO<sub>3</sub>, содержащем 10 мМ глюкозы. Извлеченные из мышей клетки АКЭ суспендировали в растворе Эрла, отмывали их этим же раствором, центрифугируя 10 мин при 1500 об/мин. Суспензию клеток в растворе Эрла вносили в лунки полистирольного круглодонного 96-луночного планшета, добавляли аликвоту золя (разведение частиц 1/10), и полученную смесь инкубировали 5 ч при 37 °С. Жизнеспособность клеток АКЭ оценивали по исключению из них трипанового синего.

*Эффективность связывания НЧАг и ФК–НЧАг с мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани мышей.* Клетки жировой ткани выделяли по методике [7]. Первичную культуру высевали в культуральные чашки в полной среде на основе ДМЕМ (среда Игла, модифицированная Дульбекко) с низким содержанием глюкозы, с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и комплекса антибиотиков (пенициллин-стрептомицин-амфотерицин) [7]. Среду меняли через 3–4 сут. Клетки пересевали по достижении конfluence, первый и последующий пассажи растили аналогично первичной культуре [7]. Для оценки связывания НЧАг и ФК–НЧАг с мезенхимальными стволовыми клетками использовали культуру четвертого пассажа.

В лунки, содержащие субконфлюэнтные (85–95%) культуры, вносили золь частиц в полной среде ДМЕМ и инкубировали при 37 °С в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 95%-ной влажности. Через 20 ч среду, содержащую несвязанные частицы и мертвые клетки, удаляли, лунки дважды промывали изотоническим раствором хлорида натрия, содержащим 10% ЭТС, и один раз раствором хлорида

натрия без сыворотки. Морфологию монослоя клеток оценивали визуально перед их удалением из лунок. Клетки снимали с пластика с помощью раствора трипсин – ЭДТА в течение 10 мин, затем добавляли избыток изотонического раствора хлорида натрия с 50% ЭТС. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Процентное содержание живых клеток в суспензии оценивали по исключению трипанового синего. Клетки, ресуспендированные в полной питательной среде, наносили на покрывное стекло, инкубировали 20 мин и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Спектры поглощения клеток на стекле регистрировали с помощью спектрометра HR 4000CG<sup>+</sup> («Осеjn Optics», США).

**Результаты и их обсуждение.** Ассоциаты ФК–НЧАг готовили двумя способами. В первом частицы синтезировали в присутствии ФК при комнатной температуре или же в условиях УЗ воздействия и постепенного увеличения температуры среды синтеза. Второй способ включал две стадии: получение НЧАг в условиях УЗ воздействия и их последующую функционализацию ФК при комнатной температуре в отсутствие УЗ обработки. В работе [4] ассоциат ФК с НЧАг подготовлен, используя аскорбиновую кислоту в качестве восстановителя Ag<sup>+</sup>, а ФК – как стабилизатор золя серебра. НЧАг сформированы при кипячении водного раствора с рН 11–12, содержащего 1,1 мМ AgNO<sub>3</sub>, 0,5 мМ ФК, 1,9 мМ аскорбиновой кислоты [4]. В этих условиях ФК не восстанавливала AgNO<sub>3</sub> в течение длительного времени.

**Синтез НЧАг в присутствии ФК.** При комнатной температуре водный раствор 0,1 мМ ФК имеет максимум поглощения при 351 нм (рис. 1, а, спектр 1, табл. 1). После добавления AgNO<sub>3</sub> водный раствор ФК быстро окрашивается в желтый цвет с максимумом в спектре поглощения при 406 нм (рис. 1, а, спектр 2, табл. 1), характерным для НЧАг. Можно предположить, что формирование НЧАг включает ряд последовательно-параллельных реакций. Одной из первых является образование серебряной соли ФК, которая практически нерастворима в воде [8] и образует зародыши новой фазы, а НЧАг формируются при восстановлении Ag(I) продуктами превращения ФК. Известно, что в водном растворе ФК атом водорода в положении С-9 способен перемещаться в положение С-6 пиазинового цикла, что приводит к дигидрооснованию Шиффа ФК, которое легко гидролизует с образованием серебряной соли *n*-аминобензоилглутаминовой кислоты и 6-дигидроптеринальдегида, превращающегося в дигидроптеринкарбоновую кислоту и дигидроптеринкарбинол [8]. По-видимому, отдельные продукты превращения ФК восстанавливают Ag(I), окисляясь до 6-птеринкарбоновой кислоты [8]. В процессе синтеза НЧАг в растворе

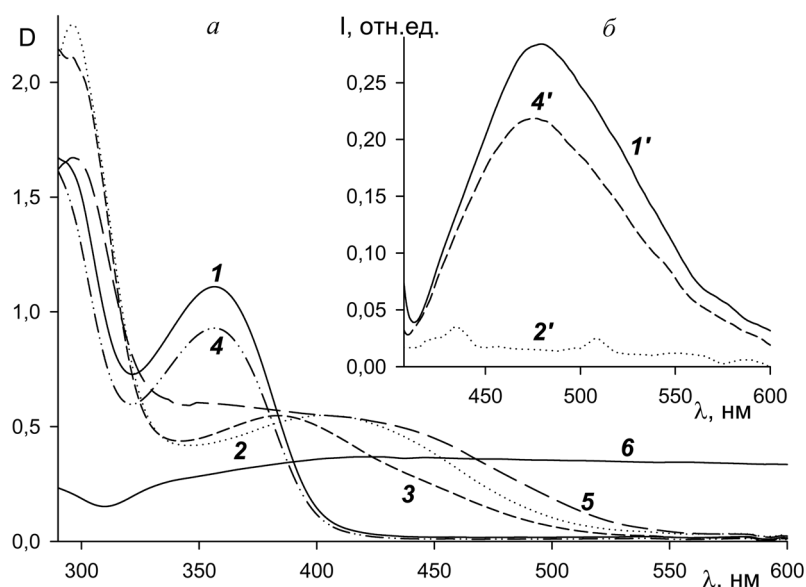


Рис. 1. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) водных растворов: 1 и 1' – 0,1 мМ ФК; 2 и 2' – 0,1 мМ ФК, 0,33 мМ AgNO<sub>3</sub>; 3 – 0,1 мМ ФК, 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,33 мМ AgNO<sub>3</sub>; 4 и 4' – 0,1 мМ ФК, 0,5% NH<sub>3</sub>×H<sub>2</sub>O, 0,33 мМ AgNO<sub>3</sub>; 5 – 0,1 мМ ФК, 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 50 мМ глюкоза, 1,0 мМ цитрат натрия, 0,33 мМ AgNO<sub>3</sub>; 6 – 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 50 мМ глюкоза, 0,33 мМ AgNO<sub>3</sub>

ФК исчезает поглощение при 351 нм (рис. 1, *a*, спектры 2, 3, 5, табл. 1), что подтверждает окисление птеридинового фрагмента ФК, так как в 0,1 Н NaOH в спектре поглощения ФК имеются максимумы при 255, 282 и 365 нм [8], два из которых (255 и 365 нм) обусловлены ее птеридиновым фрагментом [8].

Таким образом, в результате гидролиза и окисления ФК образуются *n*-аминобензоилглутаминовая, 6-птеринкарбоновая кислоты [8] и формируются НЧАг с размером 10–15 нм (рис. 1, *a*, спектр 2, табл. 1). Необходимо отметить, если раствор ФК содержит 0,5% NH<sub>3</sub>×H<sub>2</sub>O, окислительно-восстановительная реакция не протекает (рис. 1, *a*, спектр 4, табл. 1). Аминокомплекс [Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>](OH) является устойчивым соединением в отличие от аквакомплекса Ag(I) [9]. ФК не восстанавливает катион [Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (табл. 1). Поэтому образование НЧАг при комнатной температуре в растворах, содержащих NH<sub>3</sub>×H<sub>2</sub>O, не наблюдается даже в присутствии других восстановителей – глюкозы и цитрата натрия (табл. 1). Следовательно, первая стадия – образование серебряной соли ФК – является определяющей в процессе синтеза НЧАг.

Т а б л и ц а 1. Спектральные характеристики образцов, включающих 0,1 мМ ФК и компоненты среды синтеза НЧАг

Компоненты	Поглощение		Флуоресценция		
	$\lambda_{\text{max}}$ , нм	D	$\lambda_{\text{возб}}$ , нм	$\lambda_{\text{фл}}$ , нм	I <sub>max</sub> , отн. ед.
Дистиллированная вода	351	1,10	393	479	0,28
0,33 мМ AgNO <sub>3</sub>	406	0,54	372	435	0,02
10 мМ NaHCO <sub>3</sub> , 0,33 мМ AgNO <sub>3</sub>	384	0,56	375	445	0
0,5% NH <sub>3</sub> ×H <sub>2</sub> O, 0,33 мМ AgNO <sub>3</sub>	357	0,93	391	476	0,22
10 мМ NaHCO <sub>3</sub> , 50 мМ глюкоза, 1,0 мМ цитрат натрия, 0,33 мМ AgNO <sub>3</sub>	417	0,54	385	467	0
0,5% NH <sub>3</sub> ×H <sub>2</sub> O, 50 мМ глюкоза, 1,0 мМ цитрат натрия, 0,33 мМ AgNO <sub>3</sub>	357	0,87	386	465	0,21

Аминокомплекс [Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>](OH) не тушит флуоресценцию ФК (рис. 1, *b*, спектр 4). В то же время в образцах, содержащих НЧАг, ФК не флуоресцирует (рис. 1, *b*, спектр 2'). Следовательно, или НЧАг, или ионы Ag<sup>+</sup>, включенные в их двойной электрический слой, тушат флуоресценцию как ФК, так и ее птеридиновых фрагментов. Следует отметить, что флуоресцирующий противопухольный антибиотик – доксорубин, присоединенный к НЧАг, также теряет способность флуоресцировать [4].

Эффективность восстановления Ag(I) ФК в малой степени зависит от pH среды, так как в водных растворах без NaHCO<sub>3</sub> и в присутствии этой соли, повышающей pH до ~8, полученные НЧАг практически не отличались интенсивностью плазмонного резонанса (рис. 1, *a*, спектры 2 и 3, табл. 1). Однако в присутствии NaHCO<sub>3</sub> формируются частицы серебра, имеющие малый размер (<5 нм). В среде, содержащей NaHCO<sub>3</sub> и три потенциальных восстановителя Ag(I), таких как ФК, глюкоза и цитрат натрия, только ФК способствует синтезу НЧАг (рис. 1, *a*, спектр 5, табл. 1). В этих условиях образуются частицы со средним размером около 30 нм. В отсутствие ФК при восстановлении Ag(I) глюкозой получается смесь полидисперсных НЧАг серого цвета (рис. 1, *a*, спектр б).

В растворе, содержащем 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 50 мМ глюкозу, 0,33 мМ AgNO<sub>3</sub> и разные концентрации ФК в диапазоне 0,08–0,25 мМ, наблюдается небольшое увеличение интенсивности поглощения НЧАг и сдвиг максимума от 384 до 365 нм. Однако поглощение увеличивается в 2,2 раза и максимум сдвигается к 359 нм, если повысить концентрацию ФК до 0,35 мМ. По-видимому, в этих условиях количество ФК достаточно не только для восстановления Ag(I), но и для образования ассоциата с НЧАг. Так как ФК при всех использованных концентрациях (0,08–0,50 мМ) не флуоресцировала, то можно предположить, что она сама и продукты ее окисления связаны с НЧАг, которые тушат их флуоресценцию.

В условиях УЗ воздействия и восстановления Ag<sup>+</sup> одной ФК или совместно с глюкозой (табл. 2) образуется ярко-желтый стабильный золь серебра, который поглощает при 351–353 нм с одинаковой интенсивностью и имеет симметричный пик с небольшой шириной на полувысоте. По-видимому, ФК, а не глюкоза, обеспечивает восстановление Ag<sup>+</sup> и в условиях УЗ обработки (3 ч) при изменении температуры от 22 до 63 °С (табл. 2).

Таблица 2. Спектральные характеристики НЧА<sub>g</sub>, полученных в растворе, содержащем 0,5 мМ Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 7 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 мМ AgNO<sub>3</sub>, 0,3 мМ ФК и 50 мМ глюкозы

Восстановитель	3 ч УЗ		1 сут	
	D <sub>max</sub>	I <sub>max</sub> , нМ	D <sub>max</sub>	I <sub>max</sub> , нМ
ФК + глюкоза	2,13	353	2,09	349
ФК	2,09	351	2,05	349

Таблица 3. Спектральные характеристики НЧА<sub>g</sub> и ассоциата ФК–НЧА<sub>g</sub>

Восстановитель	НЧА <sub>g</sub> (УЗ в течение 3 ч)		Ассоциат ФК–НЧА <sub>g</sub> (сутки хранения)	
	D <sub>max</sub>	I <sub>max</sub> , нМ	D <sub>max</sub>	I <sub>max</sub> , нМ
Глюкоза + Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	3,21	394	3,22	405
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	0,23	390	2,20	349

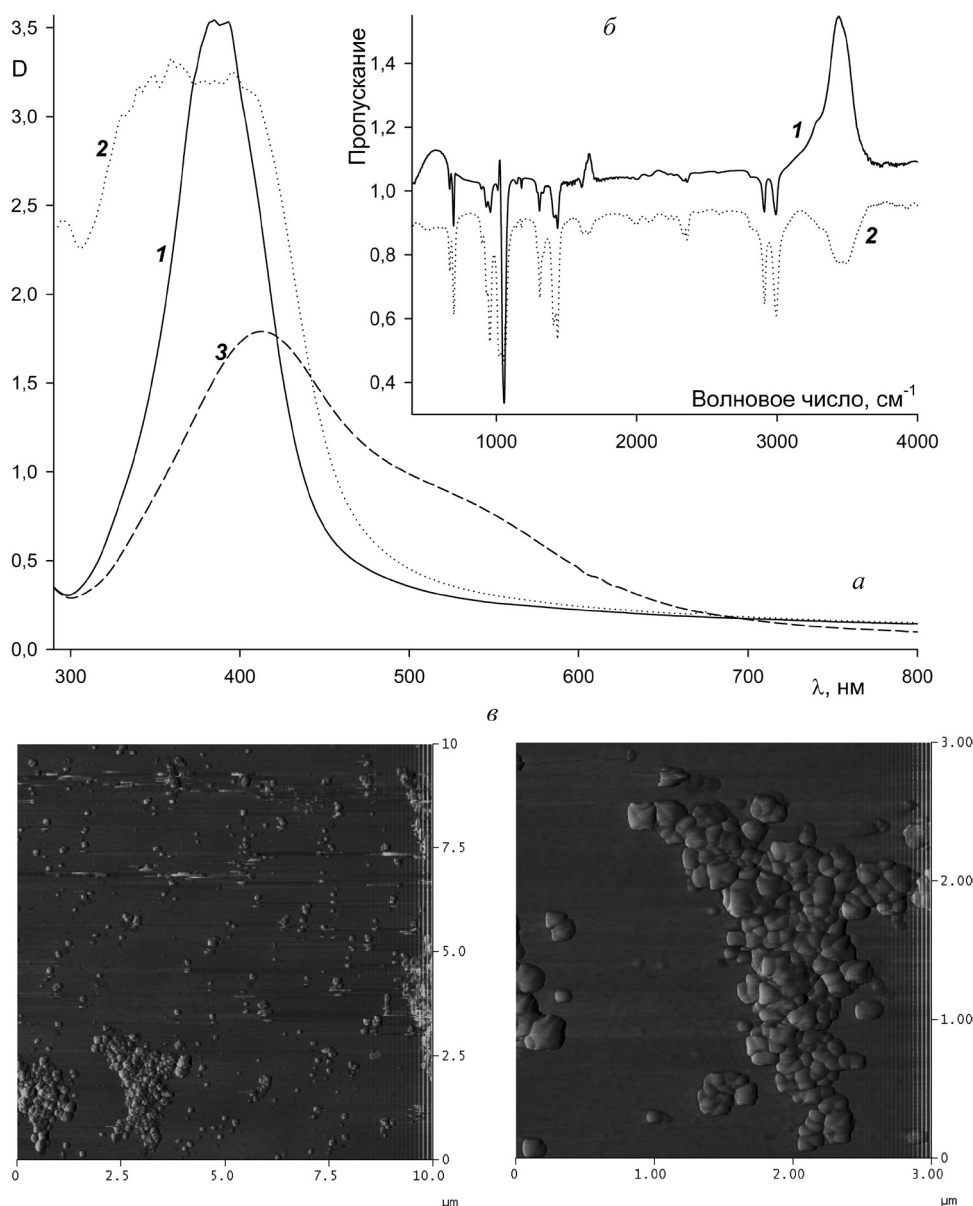


Рис. 2. Спектры поглощения (а) НЧА<sub>g</sub> до (1) и после (2) их функционализации ФК, очищенного ассоциата ФК–НЧА<sub>g</sub> в ДМСО (3). ИК-спектры (б) 0,3 мМ ФК (1) и ассоциата ФК–НЧА<sub>g</sub> (2) в ДМСО. АСМ-изображения (в) ассоциата ФК–НЧА<sub>g</sub> (окно сканирования 10×10 и 3×3 мкм; режим сканирования – «трение»)

*Двухступенчатый синтез ассоциата ФК–НЧАg.* В этом случае НЧАg получали в отсутствие ФК, которую вносили в среду синтеза частиц только после их образования, и ассоциат ФК–НЧАg формировали при комнатной температуре в течение ночи в отсутствие УЗ воздействия (табл. 3, рис. 2, *a*). НЧАg со средним размером <5 нм эффективно формируются в водном растворе, содержащем 0,5 мМ Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 мМ AgNO<sub>3</sub> и 50 мМ глюкозу, в условиях УЗ воздействия (3 ч) и изменения температуры от 23 до 63 °С (табл. 3, рис. 2, *a*, спектр 1). Если же глюкоза отсутствует, то эффективность синтеза частиц уменьшается в 14 раз (табл. 3). По-видимому, цитрат натрия практически не восстанавливает Ag<sup>+</sup>, а лишь стабилизирует золь серебра. Так как после добавления ФК до концентрации 0,3 мМ интенсивность плазмонного резонанса НЧАg практически не изменяется (табл. 3, рис. 2, *a*, спектр 2), можно заключить, что глюкозой вначале восстанавливается все азотнокислое серебро, присутствующее в растворе. Сдвиг максимума поглощения в длинноволновую область указывает на то, что ФК при связывании с НЧАg инициирует образование больших частиц (~10 нм). В системе, не содержащей глюкозу, где остался AgNO<sub>3</sub>, ФК параллельно расходуется на восстановление Ag(I) и функционализацию образующихся НЧАg (табл. 3).

Золь ассоциата ФК–НЧАg, приготовленного в процессе двухступенчатого синтеза (рис. 3, *б*), отличается высокой коллоидной стабильностью. Для осаждения ассоциата в золь добавляли NaCl или (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до их концентрации 0,3 М или же метанол, этанол, изопропанол, ацетон. Соотношение золь ФК–НЧАg – растворитель составляло 1:1. Сульфат аммония, метанол и ацетон увеличивают полидисперсность частиц, так как в их спектре поглощения обнаруживается максимум при 395–398 нм (частицы с размером <5 нм) и плечо при 484–491 нм, характерное для частиц 80–85 нм (рис. 3, *a*). Ассоциат ФК–НЧАg, осажденный NaCl, характеризуется одним максимумом при 387 нм, а в случае этанола и изопропанола – при 409–411 нм. Сульфат аммония и изопропанол способствуют наибольшему выходу ассоциата ФК–НЧАg при его выделении из среды синтеза (рис. 3, *a*, спектры 2 и 5).

В ИК-спектрах свободной ФК в ДМСО проявляются валентные колебания атомов Н, присоединенных к С, О, N, в области волнового числа 2991 см<sup>-1</sup>, колебания гетероцикла и сопряженной двойной связи при 1436,57 см<sup>-1</sup>, деформационные и валентные колебания С–О и валентные колебания С–N при волновых числах 1181–1012 см<sup>-1</sup>, характеристические колебания ароматического замещения и деформационные колебания связи N–H при волновых числах 930–697 см<sup>-1</sup>

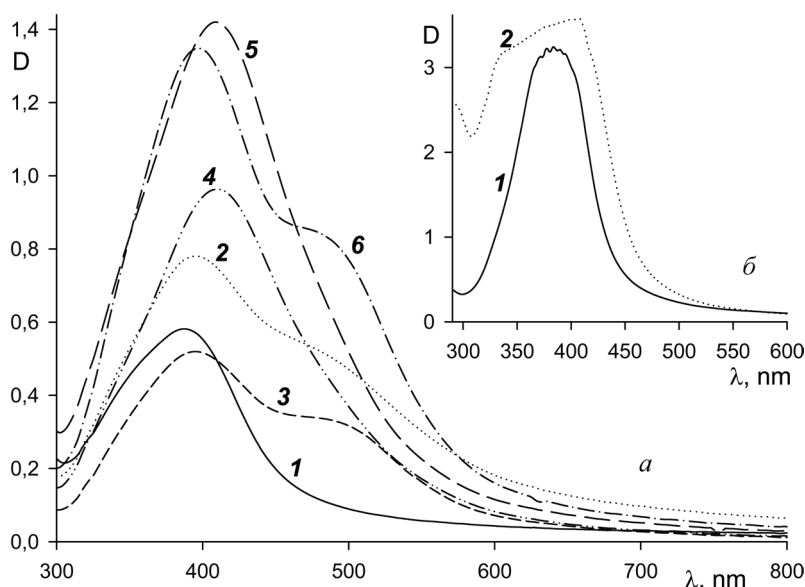


Рис. 3. Спектры поглощения (*a*) ассоциата ФК–НЧАg, осажденного из среды синтеза солями и органическими растворителями: 1 – 0,3 М NaCl, 2 – 0,3 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 – метанол, 4 – этанол, 5 – изопропанол, 6 – ацетон. Вставка (*б*): спектры поглощения НЧАg до (1) и после (2) их функционализации 0,3 мМ ФК. НЧАg получены в растворе, содержащем 0,5 мМ Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 мМ AgNO<sub>3</sub> и 50 мМ глюкозу

(табл. 4, рис. 2, б). В ассоциате ФК–НЧАг выявлены аналогичные колебания, но большей интенсивности с максимумами, сдвинутыми в основном в коротковолновую область спектра (табл. 4). Кроме того, в ИК-спектре ФК–НЧАг имеется максимум ФК при  $1605\text{ см}^{-1}$  (бензольное ядро, колебания двойной связи). Эти данные подтверждают ассоциацию молекул ФК с НЧАг.

ФК может взаимодействовать с серебром через amino- и карбоксильные группы. Так как ассоциат ФК–НЧАг отличается высокой коллоидной стабильностью и в нем не выявлена флуоресценция ФК и продуктов ее окисления, можно предположить, что связывание ФК с НЧАг осуществляется через аминогруппу птеридинового фрагмента. К аналогичному выводу пришли авторы работы [1], характеризуя присоединение ФК к НЧ золота.

Т а б л и ц а 4. Волновые числа ФК и ассоциата ФК–НЧАг в ДМСО

ФК, $\text{см}^{-1}$	ФК–НЧАг, $\text{см}^{-1}$	$D_{\text{ФК–НЧАг–ФК}}$
2991,29	2994,16	2,87
2908,96	2910,71	1,75
–	1660,41	
–	1613,64	
1436,57	1436,49	–0,08
1417,51	1408,03	–9,48
1180,61	1180,55	–0,06
1142,58	1141,82	–0,76
1056,93	1068,74	11,81
1011,55	1023,51	11,96
930,82	933,94	3,12
894,93	898,36	3,43
697,49	699,32	1,83

Как следует из табл. 5, НЧАг и ассоциат ФК–НЧАг не влияют существенно на жизнеспособность клеток АКЭ при их совместной инкубации в течение 5 ч. Мезенхимальные стволовые клетки в присутствии НЧАг и ФК–НЧАг не изменяют свою морфологию и жизнеспособность. В суспензиях клеток как контрольных, так и обработанных НЧАг и ФК–НЧАг выявлены лишь единичные погибшие клетки. В спектрах поглощения всех образцов мезенхимальных стволовых клеток, инкубированных с НЧАг и ФК–НЧАг, поглощение при 420 и 900 нм выше, чем в случае контрольных клеток, не содержащих частиц (табл. 5), что, вероятно, обусловлено наличием частиц внутри клеток или же на их поверхности. Ассоциат ФК–НЧАг связывается с мезенхимальными стволовыми клетками более эффективно, чем НЧАг, что приводит к более высоким величинам поглощения.

Т а б л и ц а 5. Жизнеспособность клеток АКЭ и поглощение при 420 и 900 нм мезенхимальных стволовых клеток, обработанных НЧАг и ассоциатом ФК–НЧАг

Образец	Жизнеспособность АКЭ, %	Мезенхимальные клетки			
		$D_{420}$	%	$D_{900}$	%
Контрольные клетки	93,5±5,3	0,39	100	0,35	100
Клетки + НЧАг	93,1±3,7	0,42	107	0,42	121
Клетки + ФК–НЧАг	93,9±4,1	0,49	126	0,45	129

**З а к л ю ч е н и е.** Ассоциаты ФК–НЧАг можно получать *in situ*, физически связывая ФК с предварительно синтезированными НЧАг или же используя ее одновременно для восстановления  $\text{Ag}^+$  и модификации образуемых наночастиц. В условиях УЗ воздействия ускоряется синтез монодисперсных НЧАг, характеризующихся симметричным пиком плазмонного резонанса. Глюкоза, цитрат натрия, продукты УЗ разложения воды в присутствии ФК не участвуют в процессе восстановления  $\text{Ag(I)}$ . ФК не восстанавливает  $\text{AgNO}_3$  в среде, содержащей  $\text{NH}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ . Для обеспечения оптимального pH синтеза НЧАг можно применять  $\text{NaHCO}_3$ . ФК, как и продукты ее окисления, ассоциированные с НЧАг, не флуоресцируют.

Золь ассоциата ФК–НЧАg отличается высокой коллоидной стабильностью. Изопропанол является наиболее эффективным растворителем для осаждения ФК–НЧАg из среды синтеза. Сульфат аммония, метанол, ацетон и ДМСО приводят к агрегации ФК–НЧАg при его выделении из среды синтеза.

НЧАg и ФК–НЧАg не влияют на жизнеспособность АКЭ и мезенхимальных клеток. Ассоциат ФК–НЧАg более эффективно связывается с мезенхимальными стволовыми клетками, чем НЧАg.

## Литература

1. Li G., Dan Li D., Zhang L., Zhai J., Wan E. // Chem. Eur. J. 2009. Vol. 15. N 38. P. 9868–9873.
2. Zhou Y., Wang X. // Nano Biomed. Eng. 2010. Vol. 2. N 4. P. 208–213.
3. Pissuwan D., Niidome T., Cortie M. B. // J. Control. Release. 2011. Vol. 149. N 1. P. 65–71.
4. Wang Y., Newell B. B., Irudayaraj J. // Biomed. Nanotechnol. 2012. Vol. 8. N 5. P. 751–760.
5. Крутяков Ю. А., Кудринский А. А., Оленин А. Ю., Лисичкин Г. В. // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 3. С. 242–269.
6. Соломянский А. Е., Жавнерко Г. К., Агабеков В. Е., Грачева Е. А. // Докл. НАН Беларуси. 2008. Т. 52. № 1. С. 75–78.
7. Lotfi A. S., Khoshdel A., Soleimani M., Daliri M., Razban V., Adibi B. // Scientific Research and Essays. 2011. Vol. 7. N 10. P. 1141–1147.
8. Березовский В. М. Химия витаминов. М.: Пищевая промышленность, 1973. С. 459–462.
9. Ахметов Н. С. Общая и неорганическая химия. М.: Высшая школа, 2001.

A. V. ABAKSHONOK, A. N. ERYOMIN, V. E. AGABEKOV, G. K. ZHAVNERKO,  
E. A. GRACHEVA, E. A. PETROVA, T. I. TERPINSKAYA

## INTERACTION OF FOLIC ACID WITH SILVER NANOPARTICLES

### Summary

The associates of folic acid (FA) with silver nanoparticles (SNPs) have been formed *in situ*, using FA both as the reducing agent for Ag (I) and for functionalization of SNPs formed, and also by FA physical adsorption on the previously prepared SNPs. FA effectively reduces Ag(I) to Ag<sup>0</sup>. Ultrasound accelerates the SNPs' **synthesis and promotes formation of monodisperse particles**. SNPs are not formed in medium containing FA and NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O. FA and the products of its oxidation associated with SNPs lose the ability of fluorescence. Isopropyl alcohol is **the most efficient solvent for precipitation of FA(SNP) associates** from the synthesis medium. SNPs and FA(SNP) associates do not reduce viability of Ehrlich's ascites carcinoma cells and mesenchymal stromal cells.